



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL  
UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



AUTOFAGOSSOMOS EM OVÓCITOS E OVOS DO INSETO VETOR  
DA DOENÇA DE CHAGAS *Rhodnius prolixus*

ARIENE SOARES FONSECA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE DUQUE DE CAXIAS

2016



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL  
UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



*AUTOFAGOSSOMOS EM OVÓCITOS E OVOS DO INSETO VETOR DA  
DOENÇA DE CHAGAS *Rhodnius prolixus**

ARIENE SOARES FONSECA

Monografia apresentada como atividade obrigatória  
à integralização de créditos para conclusão do Curso  
de Licenciatura em Ciências Biológicas -  
Modalidade EAD.

Orientador (a): Isabela Barbosa Ramos

ORIENTADOR: ISABELA BARBOSA RAMOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE DUQUE DE CAXIAS

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

SOARES-FONSECA, Ariene.

Autofagossomos em ovócitos e ovos do inseto vetor *Rhodnius prolixus*.

Polo Universitário de Duque de Caxias, Ano 2016. 48 f. il: 31 cm

Orientadora: Isabela Barbosa Ramos

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Licenciado (a) no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD. Ano 2016.

Referencias bibliográfica: f.40-41

1. Palavras Chaves: *Rhodnius prolixus*; autofagossomos; vitelo.

I. RAMOS, Isabela B.

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD

III. Autofagossomos em ovócitos e ovos do inseto vetor *Rhodnius prolixus*.



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL  
UFRJ



instituto de biologia  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ATA - DEFESA DE MONOGRAFIA DE PROJETO FINAL

NOME DO GRADUANDO (A)		MATRÍCULA
Ariene Soares Fonseca		20081402124
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB – UFRJ – EAD – POLO DUQUE DE CAXIAS		
TÍTULO DA MONOGRAFIA		
Autofagossomos em ovócitos e ovos do inseto vetor da doença de Chagas <i>Rhodnius prolixus</i>		
NOME DOS MEMBROS DA BANCA	TÍTULO	ASSINATURA
Orientador Isabela Barbosa Ramos	Doutora	
Ana Cristina Bahia Nascimento	Doutora	
Georgia Correa Atella	Doutora	
		Data: 13/07/2016
<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO (A)		<input type="checkbox"/> REPROVADO (A)
HAVENDO SUGESTÕES NA DEFESA, COLOCAR TÍTULO MODIFICADO DA MONOGRAFIA		
Sr.(a) Coordenador (a): encaminho, em anexo, a versão <u>revisada</u> do Trabalho Final de Curso nos formatos <u>impresso</u> e <u>digital</u> . Atesto que tal versão contempla as sugestões e/ou observações feitas pela banca durante a defesa.		
ORIENTADOR: 		
LOCAL E DATA 18/07/16		
COORDENADOR DO CURSO		
LOCAL E DATA		

Dedico este trabalho ao Davi, por ser minha principal via autofágica...

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora pela paciência, apoio e confiança constantes ao longo desses dois anos.

À minha família por todo amor e desvelo possíveis.

Ao professor Hatisaburo Masuda, por dividir seu amor e empolgação pela ciência.

À Helô, Lilian, Junior, Iron, Lívia, Kátia, Michele Alves, Gê, Michele Lima e George por toda ajuda e pelo bom humor indispensável desde o primeiro dia.

À banca, professores Georgia Atella e Ana Bahia, por fazer parte desse momento importante e pela atenção dada a este trabalho.

À Jéssica, Pri e Larissa, pelos momentos de distração e companhia.

Ao Vanderson, pelo conforto durante os momentos mais difíceis, por não desistir e por acreditar em mim, por vezes, mais que eu mesma.

À todos, obrigada.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. <i>Rhodnius prolixus</i> e a doença de Chagas	12
1.2. Ovogênese em <i>R. prolixus</i>	14
1.2.1. Ovogênese em <i>R. prolixus</i>	14
1.2.2. Embriogênese e degradação do vitelo em <i>R. prolixus</i>	18
1.3. Autofagia	21
1.3.1. A proteína Atg8	23
1.3.2. Regulação do fluxo autofágico	25
2. OBJETIVOS	27
3. METODOLOGIA	28
3.1. Bioinformática	28
3.2. Insetos	28
3.3. PCR e qPCR	29
3.4. Preparo dos homogenatos e dosagem de proteínas	30
3.5. SDS-PAGE e Western blotting	30
3.6. Anticorpos anti-RpAtg8	31
3.7. Quantificação de aminoácidos livres	31
3.8. Quantificação de ATP	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Análise, <i>in silico</i> , da sequência da proteína RpAtg8	33
4.2. PCR e qPCR: análise dos níveis de expressão do mRNA <i>RpAtg8</i>	34
4.3. Análise da proteína RpAtg8 durante a ovogênese e embriogênese inicial de <i>R. prolixus</i>	35
4.4. Níveis de aminoácidos livres e ATP durante a embriogênese inicial	37
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	42
7. PERSPECTIVAS	43
8. REFERÊNCIAS	44

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1: Mapa da distribuição de vetores da doença de Chagas	12
Figura 2: Ciclo de vida e proliferação de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Figura 3: Fases de desenvolvimento de <i>Rhodnius prolixus</i>	14
Figura 4: O ovário de <i>R. prolixus</i>	16
Figura 5: Endocitose dos grânulos de vitelo	17
Figura 6: Esquema de degradação do vitelo para a síntese <i>de novo</i>	18
Figura 7: Esquema de desenvolvimento embrionário.	19
Figura 8: Acidificação dos GV	20
Figura 9: Análise da dinâmica da proteólise de VT	21
Figura 10: Modelo esquemático do fluxo autofágico	22
Figura 11: Ativação e lipidação da proteína Atg8	24
Figura 12: A proteína Atg8	25
Figura 13: Resumo das vias que regulam a autofagia	26
Figura 14: Análise filogenética da proteína RpAtg8	33
Figura 15: Expressão de <i>RpAtg8</i> em amostras do ovariolo	35
Figura 16: Perfil de proteínas do vitelo durante os primeiros dias de embriogênese	36
Figura 17: Detecção da proteína RpAtg8 por Western blotting durante a embriogênese inicial	37
Figura 18: Detecção da proteína RpAtg8 por Western blotting durante a ovogênese	38
Figura 19: Gráfico das concentrações de AAL e ATP em ovos	38
Tabela 1: Sequência de <i>primers</i> de PCR	28
Tabela 2: Tabela de Identidade e Similaridade de proteínas Atg8	34



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RpAtg8	Proteína relacionada a autofagia 8
RpAtg8-PE	RpAtg8 covalentemente ligada a fosfatidiletanolamina da membrana autofágica
GV	Grânulo(s) de vitelo
VT	Vitelina
AAL	Aminoácidos livres
PE	Fosfatidiletanolamina
TOR	Complexo enzimático alvo da rapamicina
ONF	Ovo(s) não fertilizado(s)
OPV	Ovócito pré-vitelogênico
OV	Ovócito vitelogênico
OC	Ovócito corionado
AMP	Adenosina mono-fosfato
ATP	Adenosina tri-fosfato
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> – Ferramenta de alinhamento de sequências

## RESUMO

Em animais ovíparos, o embrião se desenvolve longe do corpo materno. O sucesso desse desenvolvimento depende do acúmulo de macromoléculas de reserva sintetizadas pela fêmea, chamadas de vitelo. Esses macronutrientes são estocados nos ovócitos em organelas de origem endocítica chamadas grânulos de vitelo. Ao fim do seu crescimento, o ovócito é fertilizado e posto no ambiente. Durante a embriogênese, uma parte das macromoléculas de vitelo é degradada fornecendo energia e biomoléculas fundamentais para as inúmeras reações de síntese *de novo*, crescimento e diferenciação do embrião. Esse processo é conhecido como degradação do vitelo e acontece de forma regulada em diferentes espécies. Apesar da importância desses processos para o desenvolvimento embrionário, os mecanismos celulares e moleculares que regulam a mobilização do vitelo são praticamente desconhecidos. A autofagia é um mecanismo de autodigestão celular, altamente conservado, que atua em resposta a diferentes estímulos, levando a degradação regulada e à consequente reutilização de componentes citoplasmáticos. Essa reciclagem se inicia através da formação de autofagossomos, vesículas de dupla-membrana que sequestram moléculas e organelas celulares, se fecham e se fusionam a lisossomos, levando a degradação de seu conteúdo. O principal marcador de autofagossomos é a proteína Atg8, uma vez que é localizada na membrana autofágica (Atg8-PE). Neste trabalho, investigamos se a autofagia participa dos eventos de degradação do vitelo em ovos de *Rhodnius prolixus*, através da análise da expressão da proteína RpAtg8 durante sua embriogênese e ovogênese. Nossos resultados apontam para a presença de autofagossomos durante a embriogênese e ainda, durante a ovogênese, o que sugere que a via autofágica se inicia ainda durante a formação do ovo e captação do vitelo.

Palavras-chave: embriogênese, autofagia, organelas de vitelo, Atg8.

## ABSTRACT

In oviparous animals, embryo development occurs away from the maternal body. Successful development depends on the accumulation of reserve components synthesized by the female, known as yolk. These macronutrients are stored in organelles from endocytic origin called yolk granules. A massive accumulation of yolk occurs as a key stage of oocyte growth, called vitellogenesis. At the end of vitellogenesis, the oocyte is fertilized and placed in the environment, and part of the yolk is then degraded to provide energy and biomolecules to the *de novo* synthesis reactions, growth and differentiation of the embryo cell. This process is known as yolk degradation and occurs in a regulated way in different species. Despite the importance of these processes for embryonic development, the cellular and molecular mechanisms that regulate the mobilization of the yolk are practically unknown. Autophagy is a mechanism of cellular self-digestion, highly conserved, which operates in response to different stimuli leading to controlled degradation and consequent reuse of cytoplasmic components. This recycling starts through the formation of autophagosomes, which are double-membrane vesicles that sequester molecules and cell organelles, close and fuse to lysosomes, leading to the degradation of its contents. The main autophagosome marker is Atg8 protein, once it is located at the autophagic membrane (Atg8-PE). In this work, we investigate whether autophagy participates in the yolk degradation events in *Rhodnius prolixus* eggs, by analyzing the expression of the protein RpAtg8 during its embryogenesis and oogenesis. Our results suggest the presence of autophagosomes during embryogenesis and also during oogenesis, suggesting that the autophagic pathway initiates during egg formation and yolk uptake.

Keywords: embryogenesis, autophagy, yolk organelles, Atg8.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. *Rhodnius prolixus*: Um dos vetores da Doença de Chagas

Insetos hematófagos representam potenciais vetores de doenças para humanos. Assim como o *Aedes aegypti*, vetor da dengue, febre amarela, zika e febre chikungunya, e a mosca tse-tsé, que transmite a doença-do-sono, os triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiros, são vetores do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, o parasito causador da Doença de Chagas (WHO, 2016).

O modelo de estudo desse trabalho é o barbeiro da espécie *Rhodnius prolixus*, que é um dos principais vetores das doenças de Chagas na América Latina. Abaixo, o mapa da Figura 1 mostra a distribuição majoritária dos vetores da Doença de Chagas nas Américas (Campbell-Lendrum et al., 2007; Guhl, 2007). Estima-se que esta doença seja responsável por mais de 10.000 mortes anualmente na América Latina e que atualmente 8 milhões de pessoas no mundo estejam sob risco de contágio (WHO, 2016).

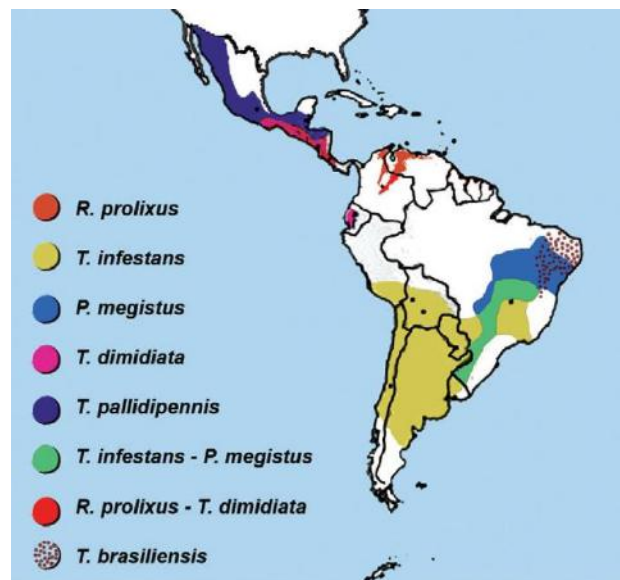


Figura 1: Mapa da distribuição das espécies de vetores da Doença de Chagas e de países que formam as iniciativas no controle da transmissão da doença de Chagas. Destaque para a região equatorial e amazônica, onde *Rhodnius prolixus* é citado como o principal vetor da doença. Adaptado de Sosa-Estani et al., 2015.

A transmissão da doença de Chagas pode ser oral, quando o hospedeiro vertebrado ingere alimentos contaminados com o parasito, por transfusões sanguíneas e

doações de órgãos, vertical, quando há contágio de mãe para feto, através da placenta, e vetorial, quando o hospedeiro invertebrado se alimenta do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado com o protozoário (Sosa-Estani et al., 2015). Nessa última situação, o intestino médio do inseto, o *T. cruzi* se diferencia na forma epimastigota e, em seguida, na forma tripomastigota metacíclica. Essa última forma é eliminada junto com a urina e fezes do inseto ao fazer o repasto sanguíneo em outro hospedeiro. Ao coçar ou esfregar a região da pele perfurada pela picada, o parasito é levado até a ferida, onde pode entrar em contato com a corrente sanguínea do novo hospedeiro, iniciar seu ciclo de vida e gerar uma consequente infecção (Figura 2).

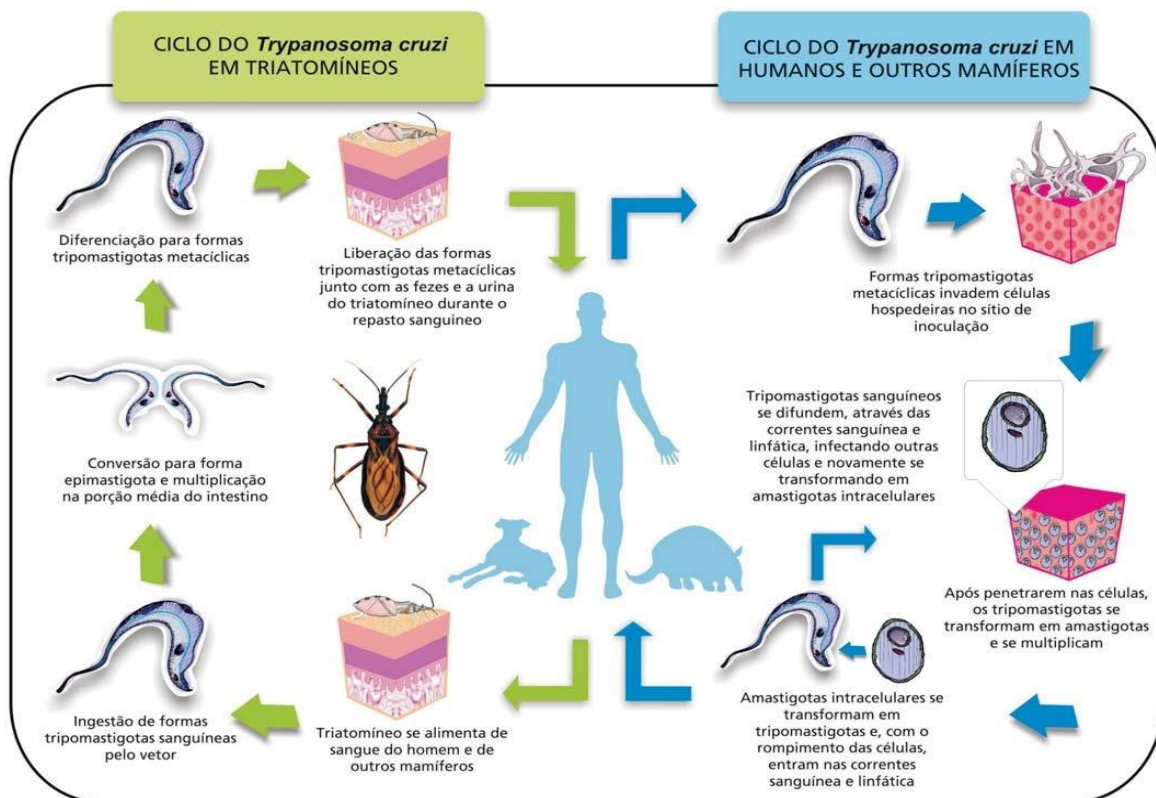


Figura 2: Ciclo de vida e proliferação de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos e em hospedeiros humanos.  
Fonte: FIOCRUZ

Ainda não há cura efetiva para a doença ou vacina que evite a proliferação do parasito. O controle da população dos triatomíneos no ambiente é uma das formas de prevenção da transmissão da Doença de Chagas (Costa and Lorenzo, 2009; WHO, 2016), tornando os estudos sobre mecanismos moleculares e celulares envolvidos com a

reprodução deste vetor especialmente importantes no contexto de erradicação desta doença.

### 1.2. Reprodução e desenvolvimento em *R. prolixus*.

Os insetos possuem alto *fitness* reprodutivo, isso significa que muitos ovos são produzidos em um curto espaço de tempos. As fêmeas de *R. prolixus*, podem produzir até 42 ovos em 21 dias após se alimentarem com sangue. O desenvolvimento do embrião leva cerca de 15 dias, quando ocorre a eclosão da ninfa de primeiro estágio. *R. prolixus* passa por cinco estádios de desenvolvimento até a fase adulta, quando ocorre o amadurecimento sexual. A alimentação com sangue é essencial para o crescimento do inseto e para o desenvolvimento e formação dos ovos.

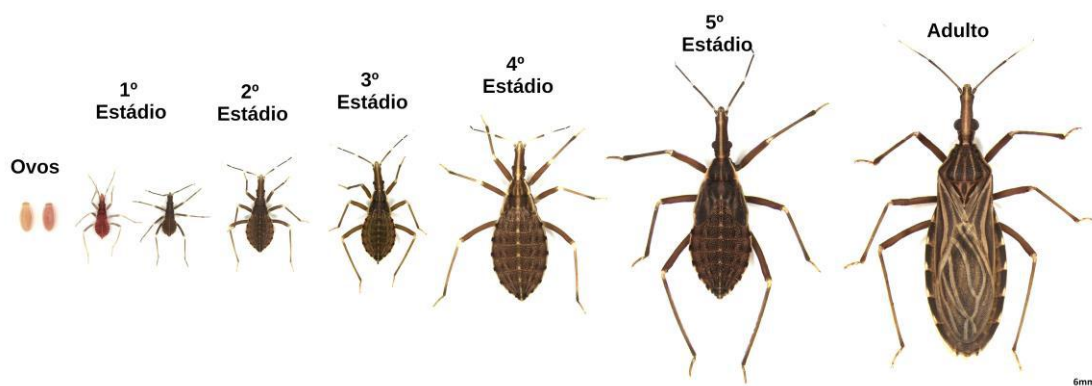


Figura 3: Fases de desenvolvimento de *Rhodnius prolixus*. Ovos, ninfas de diferentes estádios e adulto estão indicados na imagem. Adaptado de Tobias-Santos, 2016 - SDB Core.

#### 1.2.1. Ovogênese em *R. prolixus*.

A formação dos ovos depende da incorporação de macromoléculas de reserva pelos ovócitos, chamadas, em conjunto, de vitelo. A maior parte do vitelo é constituída por lipídeos e proteínas que serão, posteriormente, utilizados para o desenvolvimento embrionário (Atella et al., 2005; Melo et al., 2000; Oliveira et al., 1986, 1989; Masuda et al., 2012).

O sistema reprodutivo da fêmea de *R. prolixus* é composto por um ovário com dois hemi-ovários, localizados na cavidade abdominal de adulto. Cada um deles é formado por sete estruturas conhecidas como ovariolos, onde há a produção dos ovos (Figura 4, A e B). Cada ovariolo por sua vez, é capaz de formar até três ovócitos em sequência após uma alimentação com sangue (Atella et al., 2005; Heming and Huebner, 1994; Masuda et al., 2012).

O processo de ovogênese tem início quando uma célula germinativa presente no trofário se diferencia em um ovócito, ao entrar no primeiro ciclo meiótico (Alberts, 2015). A partir daí, enquanto o ovócito cresce ao longo do ovariolo, a ovogênese pode ser dividida em três etapas básicas: a fase de pré-vitelogênese (PV), quando se inicia a captação de vitelo; a fase de vitelogênese (Vit), onde a captação do vitelo ocorre de forma massiva, promovendo o rápido crescimento do ovócito; e a coriogênese (Cor), fase final, marcada pela formação do córion, a casca do ovo (Figura 4, C e D) (Atella et al., 2005; Heming and Huebner, 1994; Raikhel and Dhadialla, 1992; Valle, 1993; Wheeler, 1996).



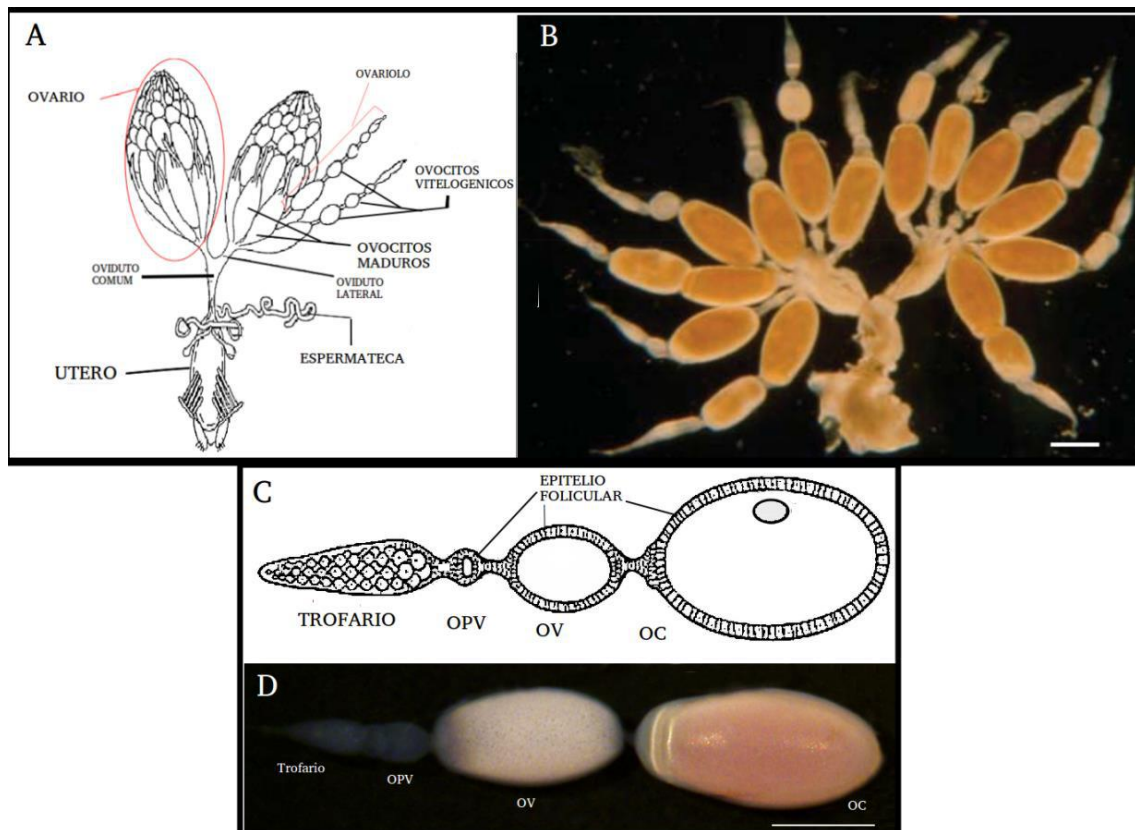


Figura 4: Ovário de *R. prolixus*. (A) Esquema gráfico de um ovário meroístico telotrófico típico de triatomíneos, destacando o ovaríolo, com ovócitos vitelogênicos, ovócitos maduros, ovidutos laterais e comum, espermateca e útero; (B) Ovário de *Rhodnius prolixus* dissecado. Adaptado de Atella et al., 2005; (C) Esquema gráfico de um ovaríolo (D) Ovaríolo real. ovócito pré-vitelogênico (OPV); ovócito vitelogênico (OV); ovócito corionado (OC). Cortesia: Isabela Ramos. Barras de escala representam 1 mm.

A vitelogênese é provavelmente o evento mais importante da ovogênese, quando os ovócitos captam uma grande quantidade de vitelo, incluindo proteínas e lipídeos. A incorporação de proteínas, especialmente proteínas de vitelo, é bastante conhecida em diversos modelos. Em *Rhodnius*, as proteínas de vitelo são produzidas pelo corpo gorduroso do inseto (órgão com funções semelhantes ao fígado de mamíferos) e pelas células do epitélio folicular que recobrem os ovócitos (Atella et al., 2005; Oliveira et al., 1986; Raikhel and Dhadialla, 1992; Santos et al., 2011).

A vitelina (VT), uma glicofosfolipoproteína, é a principal proteína de vitelo captada pelo ovócito durante a vitelogênese (Atella et al., 2005; Oliveira et al., 1986, 1989; Masuda et al., 2012). A posterior digestão da VT durante a embriogênese gera aminoácidos livres, monossacarídeos e ácidos graxos para as reações de síntese dos



tecidos em desenvolvimento do embrião. Portanto, elas representam as principais moléculas de reserva energética estocadas nos ovócitos (Atella et al., 2005; Melo et al., 2000; Masuda et al., 2012; Salerno et al., 2002; Santos et al., 2011). A captação dessas proteínas durante a ovogênese acontece através de endocitose mediada por receptores específicos, presentes na membrana dos ovócitos vitelogênicos (Figura 5, A-D) (Atella et al., 2005; Oliveira et al., 1989; Raikhel and Dhadialla, 1992; Sappington and Raikhel, 1998). O final desse processo resulta na formação de organelas envoltas por membrana e repletas de proteínas de vitelo, chamadas grânulos de vitelo (GV). A população de GV é heterogênea, apresentando grânulos de tamanho, densidade e conteúdo diferentes (Figura 5, E) (Masuda et al., 2012; Ramos et al., 2006).

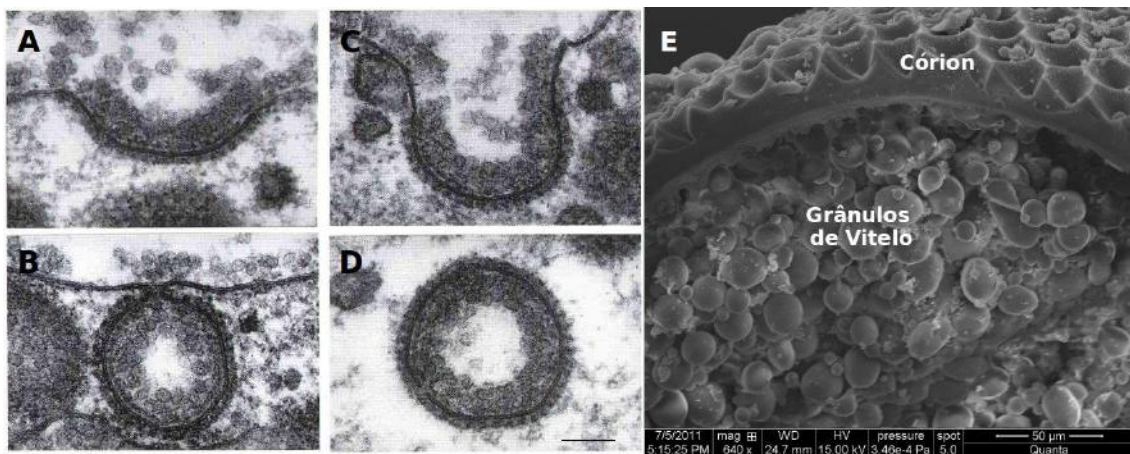


Figura 5: Endocitose do vitelo e GV's. A, B, C e D, Micrografias eletrônicas da provável formação de vesículas revestidas de clatrina na endocitose de vitelo durante a ovogênese de galinha. Barra de escala corresponde a 1 µm. Adaptado de Alberts, 2015. (E) Micrografia eletrônica de varredura de um ovócito corionado de *R. prolixus*. Cortesia: Isabela Ramos.

Além das vitelinas, enzimas lisossomais também foram identificadas nos ovócitos, sendo incorporadas a partir da hemolinfa e estocadas nos GV em alguns modelos ovíparos. Em *R. prolixus*, a catepsina D e uma fosfatase ácida estão presentes na forma inativa nos ovócitos (Fagotto, 1990a, 1990b, Fialho et al., 2002, 2005; Nussenzveig et al., 1992; Ramos et al., 2006).

Dessa forma, a ovogênese gera células altamente especializadas, com todo maquinário capaz de suprir a geração de um novo indivíduo. O conteúdo do vitelo é a

única fonte de energia e nutrientes disponível durante os quinze dias de desenvolvimento do embrião, que ocorre totalmente desconectado do corpo materno.

Após a vitelogênese, o córion é formado, o ovócito é fertilizado e colocado no ambiente, dando início ao desenvolvimento embrionário (Atella et al., 2005; Oliveira et al., 1989; Masuda et al., 2012).

### 1.2.2. Embriogênese e degradação do vitelo

O *R. prolixus* é um inseto hemimetábolo, isto significa que sua metamorfose é incompleta e a embriogênese gera uma ninfa de primeiro estágio com características morfológicas semelhantes às do inseto na fase adulta. Como dito anteriormente, o desenvolvimento embrionário desse inseto dura cerca de quinze dias, onde parte do vitelo estocado durante a ovogênese é consumido, de forma regulada, enquanto o embrião cresce (Oliveira et al., 1989, Kelly e Huebner, 1989; Berni et al., 2015).

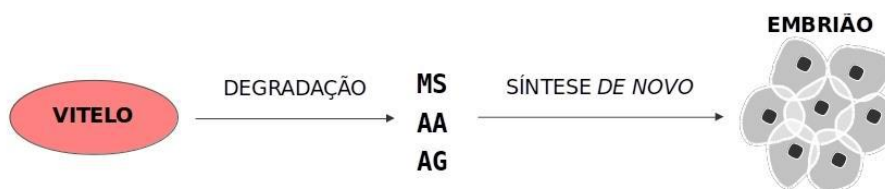


Figura 6. Esquema da degradação do vitelo para a síntese *de novo* do embrião. A fertilização dispara eventos de degradação das macromoléculas de vitelo para a mobilização de nutrientes utilizados pelo embrião durante seu desenvolvimento. MS, monossacarídeos; AA, aminoácidos; AG, ácidos graxos.

A Figura 7, adaptada de Berni et al, 2015, mostra os principais estádios de desenvolvimento embrionário. Após fertilização, as clivagens sinciciais se iniciam perto de 6h de desenvolvimento. O blastoderme se forma entre 12 e 18 horas depois da fertilização (Figura 7, A). A fase de gastrulação, com a invaginação do embrião, ocorre entre 24-30h de embriogênese (Figura 7, B), e a segmentação começa 6h depois, na região anterior do embrião (Figura 7, C). Com 48 horas de embriogênese, os apêndices cefálicos e torácicos são visíveis (Figura 7, D). A segmentação de regiões abdominais é visível em 60 horas (Figura 7, E). As fases subsequentes correspondem a fase de crescimento, onde os diferentes apêndices se desenvolvem (Figura 7, F e G). A

Katatrepis é a fase em que o embrião é submetido a uma virada de 180° e acontece entre 108-132 horas de embriogênese. Nesse momento, o embrião se fecha dorsalmente, envolvendo o vitelo restante (Figura 7, H).

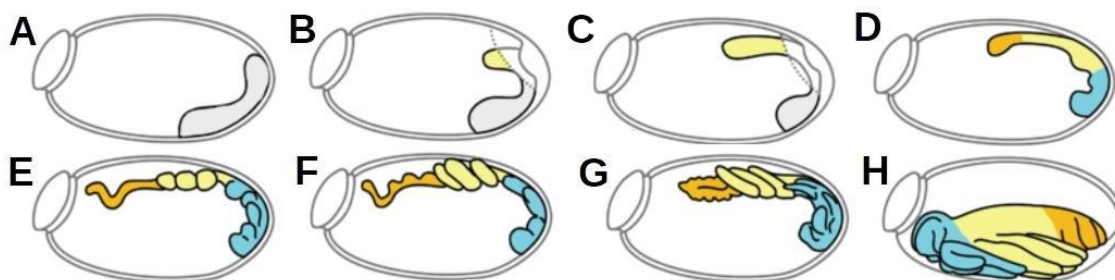


Figura 7: Esquema de desenvolvimento embrionário. Figuras indicam a formação da blastoderme com cerca de 12-18h de desenvolvimento (A) concentrado na parte posterior do ovo. A fase de gastrulação em 24-30h de desenvolvimento (B) e extensão da banda rudimentar, que ocorre em até 36h de desenvolvimento (C). A segmentação anterior ocorre com cerca de 36-48h de desenvolvimento (D). Segmentação anterior completa (E). O abdome é segmentado e o sulco neural é evidente (F). Os apêndices correspondentes às antenas crescem ao longo dos primeiros apêndices superiores (G). Na Katatrepis, o eixo antero-posterior do embrião coincide com o do ovo, graças ao giro que o embrião sofre (H). (Adaptado de Berni et al., 2015).

Então, uma vez que o ovo é fertilizado, o conteúdo dos GV, incluindo as vitelinas, deve ser degradado e mobilizado, fornecendo biomoléculas fundamentais para as reações de síntese *de novo* das células e tecidos do embrião (Atella et al., 2005). O crescimento embrionário é acompanhado pela fusão e acidificação de alguns GV, em um evento dependente de sinalização por cálcio e da atividade das bombas de íons, de forma essencial para a proteólise das vitelinas de *Rhodnius prolixus* (Fialho et al., 2002, 2005; Ramos et al., 2006).

A acidificação dos GV é mediada por bombas de prótons localizadas em sua membrana, tais como H<sup>+</sup>ATPases e H<sup>+</sup>PPases (Fagotto, 1995; Mallya et al., 1992; Motta et al., 2004; Masuda et al., 2012, 2006). A atividade dessas bombas leva a diminuição do pH do lúmen dos GV, e à consequente ativação das hidrolases ácidas. As enzimas lisossomais descritas em *R. prolixus* (a catepsina D e a fosfatase ácida) promovem a proteólise regulada das VTs (Figura 8, A).

O processo de acidificação dos GV e a consequente degradação de vitelinas é altamente conservado em animais ovíparos (Figura 8, B). Por isso, Fagotto (1995)

propôs que os GV podem ser considerados lisossomos latentes, isto é, organelas com todo o maquinário enzimático necessário para a degradação lisossomal do vitelo.

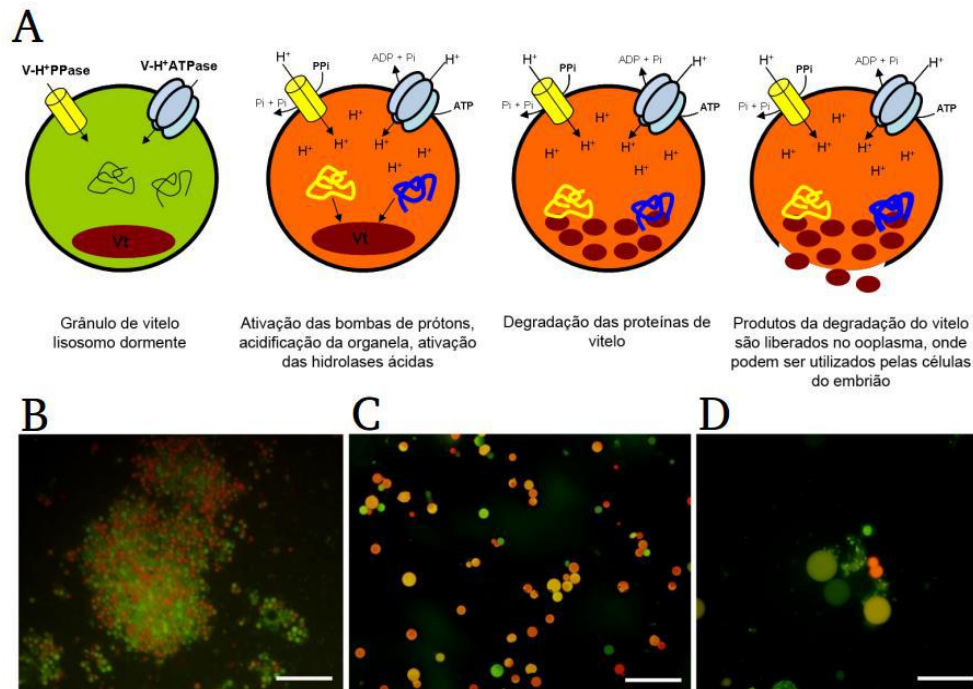


Figura 8: Acidificação dos GV. (A) Esquema de acidificação e degradação do vitelo dependente de bombas de prótons e hidrolases lisossomais. Abaixo, suspensão de grânulos de vitelo de diferentes animais incubados com Laranja de Acridina indicando baixo pH no lúmen dos grânulos fluorecendo na faixa do laranja-vermelho. (B) GVs do ouriço-do-mar *Strongylocentrotus purpuratus*, (C) GVs de ovo de galinha da espécie *Gallus gallus*, e (D) GVs do inseto *Rhodnius prolixus*. Cortesia: Isabela Ramos.

No entanto, a degradação do vitelo não acontece de forma aleatória, já que a acidificação dessas organelas acontece em estágios específicos de desenvolvimento do embrião e a VT exibe um perfil de degradação característico ao longo da embriogênese (Atella et al., 2005; Fialho et al., 2002; Fonseca et al., 2012; Masuda et al., 2012; Ramos et al., 2006; Salerno et al., 2002). Em *R. prolixus*, o produto dessa proteólise é mais evidente a partir do terceiro dia de embriogênese (Figura 9), quando o embrião se encontra no 6º estágio de desenvolvimento (final da segmentação) (Berni et al., 2015; Fialho et al., 2005; Oliveira et al., 1989).

O gráfico da figura 9 mostra ainda que cerca de 50-70% das proteínas de vitelo “sobram” no sistema digestivo da ninfa de primeiro estágio (Oliveira et al., 1989; Masuda et al., 2012; Salerno et al., 2002; Santos et al., 2011). Essa estratégia garante que a ninfa esteja literalmente alimentada ao nascer e tenha cerca de cinco dias para

achar um hospedeiro e se alimentar pela primeira vez (Atella et al., 2005; Fonseca et al., 2012).

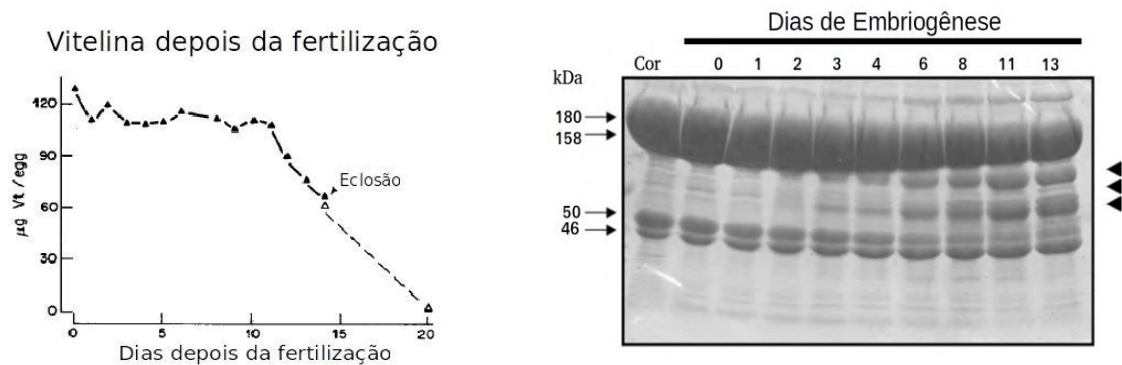


Figura 9: Análise da dinâmica da proteólise de VT e do perfil de proteínas durante a embriogênese. O gráfico (esquerda) mostra as concentrações de vitelina no ovo durante os quinze dias de embriogênese, e na ninfa de primeiro estágio cinco dias após a eclosão (Adaptado de Oliveira et al., 1989). O SDS-PAGE (7.5%) (direito) mostra o perfil de proteínas de vitelo, especialmente da vitelina, em ovócitos corionados (Cor) e de ovos em diferentes dias de embriogênese, sendo '0', ovos com menos de 24 depois da oviposição e assim continuamente. As setas indicam vitelinas e as cabeças de setas, fragmentos proteolíticos da degradação de vitelinas, que se inicia no terceiro dia de embriogênese (Adaptado de Fialho et al, 2005).

Embora se tenha algum conhecimento sobre os mecanismos de regulação da degradação do vitelo (como, por exemplo, a acidificação diferencial e fusão dos GV) e da importância desses eventos para mobilização do conteúdo dos GV para as células do embrião, pouco se sabe sobre como é regulada a seleção dos grânulos que devem ou não passar pelo processo de acidificação e sobre os mecanismos que regulam a proteólise característica das vitelinas e de outras macromoléculas de vitelo.

### 1.3. Autofagia

A autofagia é um via catabólica amplamente conservada entre eucariotos que, em resposta a diferentes estímulos, promove a degradação de componentes citoplasmáticos. A autofagia ocorre normalmente em níveis basais nas células, entretanto, quando o organismo se encontra em jejum prolongado, o fluxo autofágico aumenta, gerando biomoléculas fundamentais que serão reaproveitados para manter a homeostase celular (Alberts, 2015; Chen et al., 2014; McPhee and Baehrecke, 2009; Meléndez and Neufeld, 2008; Nagy et al., 2015).



O fluxo autofágico se inicia quando uma vesícula se forma em torno de componentes celulares previamente marcados para serem degradados. Essa estrutura, chamada autofagossomo, é fusionada com o lisossomo e a digestão do seu conteúdo é feita por enzimas lisossomais. Esse evento acontece em pelo menos quatro etapas. A primeira envolve a sinalização que induz o isolamento e a nucleação de uma vesícula de membrana dupla, denominada fagóforo que, posteriormente, dará origem ao autofagossomo (Parzych and Klionsky, 2014; Russell et al., 2014; Yen and Klionsky, 2008). Logo, essa membrana sofrerá um processo de extensão e prolongamento em volta de uma porção citoplasmática específica, onde estão organelas e moléculas alvo para a degradação. Na próxima etapa, se dá o fechamento do autofagossomo e, finalmente a fusão com um lisossomo (Figura 10, A). Em alguns casos endossomos tardios podem se fundir a autofagossomos formando uma organela chamada anfissomo, dando seguimento a via (Figura 10, B). (Alberts, 2015; Meléndez and Neufeld, 2008; Shintani and Klionsky, 2004; Xie and Klionsky, 2007).

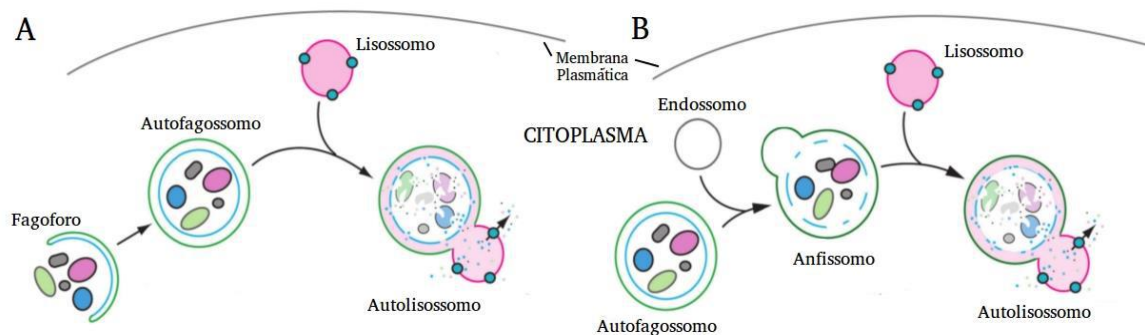


Figura 10: Modelo esquemático do fluxo autofágico. Em A, uma membrana dupla chamada fagóforo é formada e sofre expansão e curvatura levando ao engolfamento de componentes citoplasmáticos. Em sequência, essa organela se funde com um lisossomo, formando um autolisossomo, e seu conteúdo, incluindo a membrana interna, é degradado. B mostra uma via alternativa onde um endossomo se funde com um autofagossomo formado como em A, originando um anfissomo, que se funde com o lisossomo, seguindo o fluxo autofágico como em A. Adaptado de (Klionsky et al., 2016).

A relação entre a degradação do vitelo em *R. prolixus* e autofagia se baseia no fato de que se trata de vias clássicas de degradação massiva de um conteúdo citoplasmático específico e que depende da fusão com lisossomos ao fim. Para estudar a autofagia nos ovócitos e nos ovos de *R. prolixus*, selecionamos o principal marcador de autofagossomos, a proteína Atg8.

### 1.3.1. A proteína Atg8 na autofagia

Foram identificados mais de 35 genes relacionados com a autofagia na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que são reconhecidos pela sigla ATG (*AuTophagy*) seguida de um número, assim como a proteína que eles codificam (Tsukada and Ohsumi, 1993). Dentre elas, está a principal proteína marcadora da formação do autofagossomo, a Atg8. Quando a via autofágica é disparada, a proteína Atg8 é conjugada por uma ligação covalente ao lipídeo fosfatidiletanolamina (PE) da membrana do autofagossomo, em um passo considerado essencial para o prolongamento e fechamento da vesícula autofágica (Knorr et al., 2014; Meléndez and Neufeld, 2008; Nagy et al., 2015; Shpilka et al., 2011; Tanida et al., 2004; Xie et al., 2008).

A regulação e ativação da Atg8 acontecem depois que ela é traduzida. Em situações onde os níveis energéticos e nutricionais da célula são considerados favoráveis para suas reações metabólicas, a proteína se encontra estocada livremente no núcleo, e só quando há aumento no fluxo autofágico, mediante algum estímulo, ela é ativada e transportada para o fora do núcleo (Nair et al., 2012; Shpilka et al., 2011; Xie and Klionsky, 2007). A primeira reação de ativação da proteína Atg8, ainda no núcleo, consiste na desacetilação de dois resíduos de aminoácidos por uma histona desacetilase, a Sirt1. Nesse momento, a proteína é transportada para o citoplasma e sofre clivagem em sua porção carboxila-terminal, expondo um resíduo de glicina, em uma reação mediada pela Atg4, uma cisteína protease (Hong et al., 2014; Shpilka et al., 2011; Slobodkin and Elazar, 2013; Spowart and Lum, 2010). Em seguida, as reações são semelhantes as reações de ubiquitinação (Figura 11). A enzima do tipo E1 ativadora, Atg7, é ligada ao resíduo de glicina do Atg8 em uma reação que depende de ATP. A Atg7 é subsequentemente trocada pela Atg3, uma enzima tipo E2 conjugadora que age junto com um complexo enzimático com função do tipo E3 formado pela Atg5, Atg12 e Atg16, que finalmente catalisa a ligação covalente entre a Atg8 e o fosfolipídeo PE da membrana do autofagossomo (Huang et al., 2015; Klionsky et al., 2016; Knorr et al., 2014; Mauvezin et al., 2012; Murrow and Debnath, 2015; Spowart and Lum, 2010; Tanida et al., 2004).

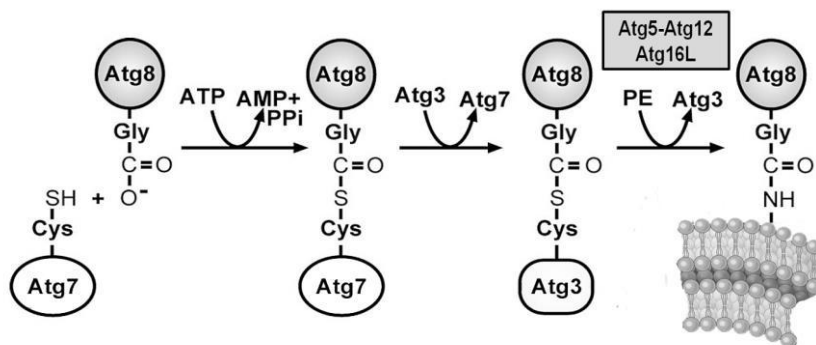


Figura 11: Reações de conjugação da proteína Atg8 à PE. Etapas das reações do tipo ubiquitinação da proteína Atg8 a PE na membrana do autofagossomo. Adaptado de Shpilka et al., 2011.

É bem descrito que a conjugação da proteína Atg8 a PE promove a curvatura da membrana autofágica, o que auxilia o fechamento do fagóforo. Além disso, essa forma também está associada a posterior fusão com lisossomos ou com endossomos tardios (Klionsky et al., 2016; Knorr et al., 2014; McPhee and Baehrecke, 2009; Meléndez and Neufeld, 2008; Xie et al., 2008). Experimentalmente, a presença de Atg8-PE é o principal indicativo da formação de um autofagossomo, e isso pode ser facilmente monitorado através da técnica de Western blotting, graças ao padrão de migração diferencial da proteína ligada a PE, como mostra a figura 12, C. Além disso, experimentos de imunolocalização desta proteína ou sua detecção quando acoplada a um fluoróforo são comumente utilizados para identificar autofagossomos em diferentes sistemas celulares (Figura 12, A e B) (Klionsky et al., 2016; McPhee and Baehrecke, 2009; Meléndez and Neufeld, 2008).



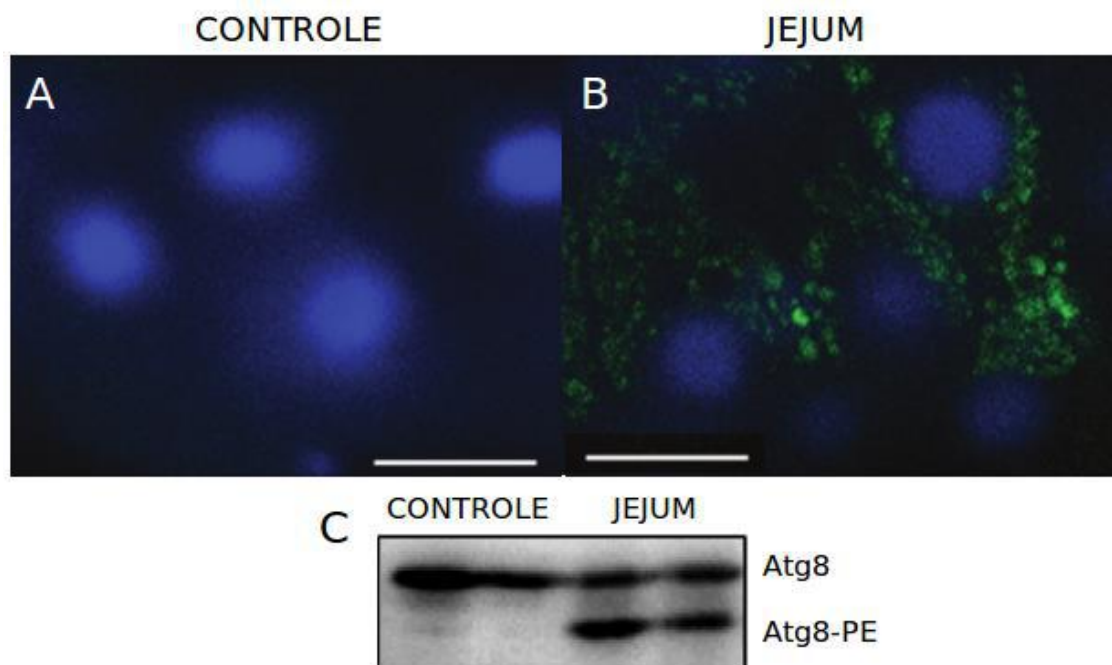


Figura 12: Monitorando autofagia através da proteína Atg8. (A) Micrografia de fluorescência de intestino médio de *Drosophila melanogaster*. Pontos verdes são referidos como a proteína (GFP-)Atg8 associada a autofagossomos, azuis se referem ao núcleo das células. Barras de escala: 1  $\mu$ m. Adaptado de Klionsky et al., 2016. (B) Western blotting marcando Atg8 em células normais nutricionalmente (normal), e em células com pouco nutrientes (fome). Adaptado de Xie and Klionsky, 2007.

### 1.3.2. Regulação do fluxo autofágico

Fatores de crescimento e os níveis de determinados nutrientes refletem a situação energética das células e podem regular o fluxo autofágico via o complexo TOR (*target of rapamicin* – alvo da rapamicina). Esse complexo funciona como um centro de sinalização celular, e quando se encontra ativo, isto é, com a TOR fosforilada, inibe o fluxo autofágico e estimula o crescimento e divisão celular. O complexo TOR pode ser regulado pela enzima AMPK, sensível ao aumento nos níveis de AMP no citoplasma da célula. Em condições onde os níveis de AMP aumentam (refletindo na maioria dos casos uma diminuição nos níveis de ATP), TOR é inativada pela AMPK, e o fluxo autofágico é aumentado. As concentrações de aminoácidos livres também regulam TOR. Da mesma forma, TOR é inativada quando os níveis aminoácidos livres caem,

como pode ser observado na Figura 13 (Jewell et al., 2013; Meléndez and Neufeld, 2008; Parzych and Klionsky, 2014; Russell et al., 2014; Yen and Klionsky, 2008).

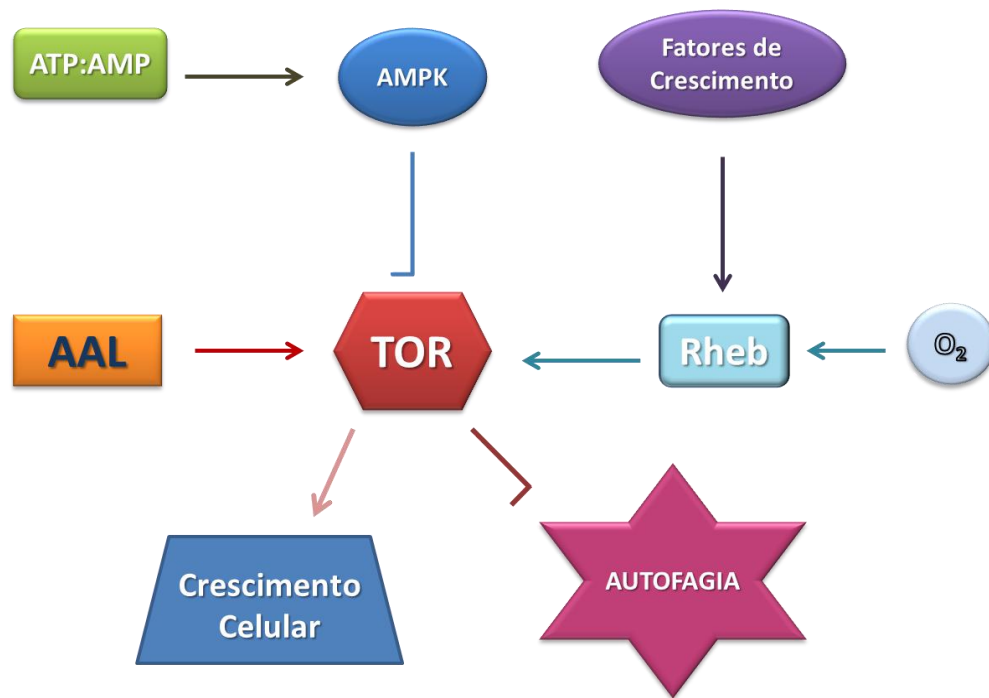


Figura 13: Resumo das vias que regulam a autofagia através dos níveis energéticos e nutricionais da célula. A razão entre as concentrações de ATP e AMP ativam a AMPK que promove a inibição de TOR. Altas concentrações de aminoácidos livres citoplasmáticos ativam a TOR, tal como a GTPase Rheb em resposta *downstream* a fatores de crescimento e/ou hipóxia.

Tendo em vista que o catabolismo do vitelo e a autofagia são vias conservadas de degradação massiva de um conteúdo citoplasmático específico e, que dependem da fusão com lisossomos, selecionamos o principal marcador de autofagossomos, a proteína Atg8, para investigar a possível participação do fluxo autofágico durante a degradação das macromoléculas de vitelo na embriogênese inicial de *R. prolixus*.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho é procurar por evidências que a autofagia participa dos processos de degradação das proteínas de vitelo durante o início da embriogênese em *R. prolixus*. O trabalho é construído sobre a hipótese de que as algumas organelas de vitelo podem ser caracterizadas como autofagossomos adormecidos formados durante a ovogênese, e ativados somente após a fertilização do ovócito, quando o desenvolvimento embrionário se inicia.

Dos objetivos específicos desse trabalho, destacam-se:

- Buscar a sequência homóloga do gene *RpAtg8*.
- Analisar os níveis de expressão do mRNA deste gene em ovócitos e ovos de *R. prolixus*.
- Analisar o padrão de conjugação da proteína *RpAtg8* a fosfatidiletanolamina, como indicativo de formação de autofagossomos em ovócitos e ovos do inseto.
- Buscar por fatores celulares que estão relacionados com o aumento do fluxo autofágico, tal como a concentração de aminoácidos livres e níveis de ATP no citoplasma de ovos de *R. prolixus* durante os primeiros dias de embriogênese.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Bioinformática:

A sequência nucleotídica do gene *RpAtg8* foi identificada no transcriptoma de *Rhodnius prolixus* (disponível na plataforma *Vector Base*) a partir do alinhamento com o gene *DmAtg8a* de *Drosophila melanogaster* (ID: 32001). A sequência da proteína Atg8 foi obtida a partir da sequência de nucleotídeos de *RpAtg8*, através das ferramentas de bioinformática de EMBL-EBI, disponibilizadas pelo European Bioinformatics Institute em <http://www.ebi.ac.uk/>, assim como o alinhamento das sequências de proteínas Atg8 de diferentes espécies. As sequências de *primers forward* e *reverse* para PCR foram obtidas pela Exxtend Oligos (Campinas, SP. Brasil) e estão descritas na Tabela 1.

Gene	Sequência senso	Sequência anti-senso
<i>RpAtg8</i>	5'-GAACAATGTAATCCCACCGACAAG-3'	5'-CCATAGACATTTTCATCACTATACGC-3'
<i>RpActin</i>	5'-CCATGTACCCAGGTATTGCT-3'	5'-ATCTGTTGGAAGGTGGACAG-3'

Tabela 1: Sequências *primers forward* e *reverse* usadas como molde para DNA polimerase na técnica de PCR. *RpAtg8*, gene *Atg8*, e *RpActin*, gene da *actina* (Majerowicz et al., 2011), ambos de *R. prolixus*.

#### 3.2. Insetos:

Os insetos *R. prolixus* usados neste trabalho são alimentados com sangue de coelho e criados em colônia mantida a 28 °C, a 80 – 90 % de umidade relativa, sob um fotoperíodo de 12h no claro e 12h no escuro. Insetos de 5º estágio foram separados individualmente antes de alcançar maturidade sexual, isto é, antes de entrar na fase adulta. Após a muda para a fase adulta, ovos das fêmeas virgens não-fertilizados e ovos fertilizados foram coletados e usados para extração de RNA. Os ovos usados para *Western blotting* foram coletados a cada hora. Nos dois casos, os ovos foram utilizados imediatamente ou foram deixados para desenvolverem por um tempo determinado, relacionado com a fase de embriogênese requerida. Para dosagem de aminoácidos

livres, os ovos foram coletados a cada hora e homogeneizados nos pontos desejados de desenvolvimento embrionário. Para extração de RNA e proteína das células do ovário, os insetos foram dissecados e os tecidos foram imediatamente limpos em salina (NaCl 150 mM) a 4 °C antes de proceder conforme itens abaixo.

### 3.3. PCR e qPCR para *RpAtg8*:

O RNA total foi extraído de ovários de fêmeas vitelogênicas cinco dias depois da alimentação e de ovos até o terceiro dia de embriogênese e isolado utilizando o reagente TRIzol Ambion (Life Technologies) em quatro etapas. A primeira etapa compreende a homogeneização de ovócitos e trofários extraídos de três fêmeas vitelogênicas para cada experimento ( $n = 3$ ) em 0,5 mL de TRIzol em um tubo autoclavado. O material foi centrifugado a  $18.800 \times g$  por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e transportado para um tubo autoclavado contendo 0,2 mL clorofórmio e agitado vigorosamente por 3 minutos. Após 2 minutos a temperatura ambiente, o material foi centrifugado novamente como descrito acima. Em seguida, a fase aquosa foi retirada e transportada para outro tubo autoclavado contendo 0,2 mL de isopropanol. A nova solução foi misturada por inversão, e então, deixada a temperatura ambiente por 10 minutos. A etapa de centrifugação foi repetida e o precipitado foi isolado do sobrenadante. Na última etapa, foi adicionado 0,2 mL de etanol absoluto ao precipitado sem ressuspendê-lo novamente, e estocado por pelo menos 30 minutos a -20°C. Após essa pausa, o etanol foi retirado e o RNA foi ressuspendido em 20 µL de água tratada com DEPC. A leitura para quantificação do total de RNA extraído foi feita a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific). O RNA foi tratado com DNase por 30 minutos e a enzima foi inibida por EDTA 50 mM (ambos Fermentas, Fisher Scientific). O cDNA para *RpAtg8* foi sintetizado a partir de 1 µg do total de RNA extraído utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Applied Biosystems). O experimento de PCR (Polimerase Chain Reaction) foi realizado de acordo com um protocolo padrão (35 ciclos,  $T_M$  52°C) e o experimento de qPCR (Quantitative Polimerase Chain Reaction) foi conduzido pelo sistema de PCR-RealTime One-Step Plus utilizando SYBR-green Master mix (Applied Biosystems),

com 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, para desnaturação do cDNA, e 60°C por 60 segundos (anelamento e extensão) para amplificação. O método comparativo utilizado foi  $-2^{\Delta\Delta C_t}$ . O gene *RpActin* (GenBank ID: EU233794) foi utilizado como gene de referência endógeno (Majerowicz et al., 2011) e os *primers* da actina usados nos PCRs foram cedidos gentilmente pelo professor David Majerowicz (sequências na tabela 1). Todos os experimentos de PCR quantitativo foram feitos em triplicatas, com *n* experimental de cinco repetições.

#### 3.4. Preparo dos homogenatos e dosagem de proteínas:

Os homogenatos para extração total de proteínas de ovócitos e ovos foram feitos em 10 mM de HEPES (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*) com inibidores de proteases (Aprotinina 0,3 µM, Leupeptina 1µg/ml, Pepstatina 1µg/ml, PMSF 0,1mM e EDTA 1mM). 15 trofários e ovócitos pré-vitelogênicos e 8-10 ovócitos vitelogênicos e corionados foram extraídos de fêmeas vitelogênicas (5 dias após a alimentação), dissecados e homogeneizados com poder de plástico em 50 µL do tampão. Ovos em diferentes tempos de embriogênese foram homogeneizados na proporção de um ovo para 25 µL do tampão. A dosagem de proteínas do material foi realizada conforme o protocolo de Folin (Lowry et al., 1951).

#### 3.5. SDS-PAGE e Western blotting:

Os homogenatos foram diluídos em tampão de amostra (TRIS 300 mM, pH 6.8, SDS 10%, Sacarose 37,5%, 0,05% de Azul de Bromofenol (ABF) e 12,5% de 2-mercaptoetanol) na proporção de 1:5, exposto a 100°C por 5 minutos, para desnaturação das proteínas. 45-60 µg de proteínas de ovos em diferentes tempos da embriogênese inicial, com tampão de amostra, foram submetidos a um SDS-PAGE 12,5% para separar as proteínas, e transferidas para uma membrana de nitrocelulose por 1 h e 30 minutos a 200 mA imersa em tampão de transferência (TRIS 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, 20% de metanol). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau Red 10 % para testar a confiabilidade da transferência.

Para os *Western blottings*, as membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com tampão de bloqueio (TB) TBS (TRIS 10 mM pH 7.5, NaCl 0,15 M), 0,1 % de Tween-20 e 5% de leite desnatado Molico, por uma hora. Em seguida, as membranas foram incubadas sob agitação *overnight* a 4°C com 0,04% de antisoro contendo os anticorpos anti-RpAtg8 (descrito no item 3.6) diluído em TB. Após esse tempo, as membranas foram lavadas em TB três vezes por 10 minutos, e incubadas por uma hora com anticorpo secundário conjugado com a enzima peroxidase (HRP) diluído na proporção 1:3000 em TB, e lavada novamente por 10 minutos duas vezes com TB, e uma vez com TBS pH 7.0. Em seguida, a membrana foi submetida por 1 minuto à mistura das duas soluções de ECL (*Enhanced chemiluminescence*). As proteínas foram detectadas após as membranas serem expostas por 5 minutos em filme radiográfico, e revelada com solução reveladora para filme radiográfico Carestream Kodak Autoradiography GBX Developer até o contraste das bandas ser visível.

### 3.6. Anticorpos anti-RpAtg8:

Anticorpos policlonais de coelhos anti-RpAtg8 foram gerados contra a sequência peptídica do N-terminal da proteína (NH<sub>2</sub>-MKFQYKEEHPFEKRKC-COOH) adquirido pela empresa FastBio Ltda. (Ribeirão Preto, SP. Brasil). O anticorpo secundário fusionado com HRP feito em cabra anti-Fc de coelho adquirido pela empresa Santa Cruz Biotechnology (Lote: H0614; Paso Robles, CA. USA).

### 3.7. Quantificação de aminoácidos livres:

Os ovos e ovócitos corionados foram homogeneizados em 6% de TCA (ácido tricloroacético) e neutralizados com TRIS 1 M pH 8.0, na proporção de 8 µL de TCA e 8 µL de TRIS para cada ovo homogeneizado. Os aminoácidos livres no citoplasma de ovócitos e ovos foram quantificados por colorimetria em um espectrofotômetro com base em uma curva padrão de glicina, usando 8% de ninidrina em acetona como reagente colorimétrico. As proporção dos reagentes são, 1:7:2, de amostra, água e solução de ninidrina a 8%, respectivamente. Após 3 minutos em banho seco a 100°C, a

solução foi retirada, 2 partes de álcool 50% foram adicionadas e a amostra foi centrifugada a 9.600 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para detecção de absorvância da reação colorimétrica a 570 nm em um leitor de microplacas EMax Plus (Molecular Devices).

### 3.8. Quantificação de ATP:

Ovos no início da embriogênese (com até 96h depois da ovoposição) e ovócitos corionados coletados de fêmeas vitelogênicas dissecadas 5 dias após a alimentação, foram homogeneizados em 6% de TCA (ácido tricloroacético) e neutralizados com TRIS 1 M pH 8.0, na proporção de 8 µL de TCA e 8 µL de TRIS para cada ovo/ovócito homogeneizado. O material foi centrifugados a 9.600 x g por 5 minutos a 4 C. Alíquotas de sobrenadante (200 µL) foram analisadas por HPLC de acordo com Walter-Nuno et al., 2013.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise *in silico* da proteína RpAtg8.

Foi essencial para dar início ao trabalho a análise dos transcriptomas do inseto. Isto porque, até o presente momento, ainda não haviam sido descritos na literatura genes relacionados a autofagia em *R. prolixus*. Usando como referência a sequência de nucleotídeos do transcrito de *Atg8* de *Drosophila melanogaster*, identificamos no transcriptoma do *R. prolixus*, através de alinhamentos pelo BLAST, a sequência correspondente ao mRNA do gene *RpAtg8*. A partir desse transcrito, foi possível realizar uma breve análise filogenética por comparações entre a sequência de aminoácidos de RpAtg8 com as sequências Atg8 de outras oito espécies (Figura 14).



Figura 14: Análise filogenética da proteína RpAtg8. Alinhamento da sequência de aminoácidos de proteínas homólogas do Atg8 em *Saccharomyces cerevisiae* (ScAtg8); *Homo sapiens* (HsAtg8); *Mus musculus* (MmAtg8); *Bombix mori* (BmAtg8); *Drosophila melanogaster* (DmAtg8); *Rhodnius prolixus* (RpAtg8); *Periplaneta americana* (PaAtg8); e *Tenebrio molitor* (TmAtg8) (Clustalw 2.1).

Em *R. prolixus*, a sequência codificante para o mRNA do gene *RpAtg8* tem 354bp e codifica uma proteína predita de 13.8 kDa. Também foi possível observar que a sequência da *RpAtg8* é bem conservada entre o grupo Insecta, tendo mais de 90% de similaridade com a proteína Atg8 dos insetos listados na Tabela 2, além de mais de 75% com a proteína homóloga da levedura *S. cerevisiae* e mais de 90% com a proteína homóloga LC3 de *H. sapiens* (Tabela 2).

Identidade							
	RpAtg8	DmAtg8a	BmAtg8	PaAtg8	TmAtg8	ScAtg8	HsAtg8
RpAtg8	100%	89.25%	92.56%	95.86%	91.73%	57.85%	84.29%
DmAtg8a	93.38%	100%	90.08%	92.56%	90.9%	53.71%	81.81%
BmAtg8	96.69%	95.86%	100%	95.86%	91.73%	57.85%	84.29%
PaAtg8	97.52%	95.04%	99.17%	100%	95.04%	59.5%	86.77%
TmAtg8	95.04%	95.86%	95.86%	96.69%	100%	55.37%	83.47%
ScAtg8	78.51%	73.55%	76.85%	77.68%	75.2%	100%	56.19%
HsAtg8	91.73%	88.42%	91.73%	92.56%	90.08%	75.2%	100%
Similaridade							

Tabela 2: Tabela de identidade e similaridade. Valores obtidos para identidade e similaridade entre proteínas Atg8. *Periplaneta americana* (PaAtg8), *Tenebrio molitor* (TmAtg8), *Rhodnius prolixus* (RpAtg8), *Drosophila melanogaster* (DmAtg8), *Bombyx mori* (BmAtg8), *Homo sapiens* (HsAtg8), *Saccharomyces cerevisiae* (ScAtg8). As sequências foram alinhadas usando o algoritmo padrão do ClustalW.

#### 4.2. PCR e qPCR: análise dos níveis de expressão do gene *RpAtg8*.

O transcriptoma do *R. prolixus* é uma biblioteca de RNAs extraídos de todos os tecidos do inseto, sem distinção, portanto, foi preciso investigar se o mRNA *RpAtg8* era expresso nos tecidos de nosso interesse. Para tal, foram feitos PCRs convencionais com amostras de trofário, de ovócitos em diferentes fases de crescimento, e em ovos no início da embriogênese (até o terceiro dia depois da ovoposição) (Figura 15, A e B). Essas mesmas amostras foram ainda submetidas ao PCR em tempo real (qPCR), e os resultados mostram que além do mRNA *RpAtg8* ser expresso nesses tecidos, seus níveis de expressão aumentam cerca de 70 % após 96h de desenvolvimento embrionário (D3),

em comparação com as primeiras 24h (D0) (Figura 15, C). Esse é o ponto onde a proteólise das vitelinas começa a ser mais evidente (Fialho et al., 2005).

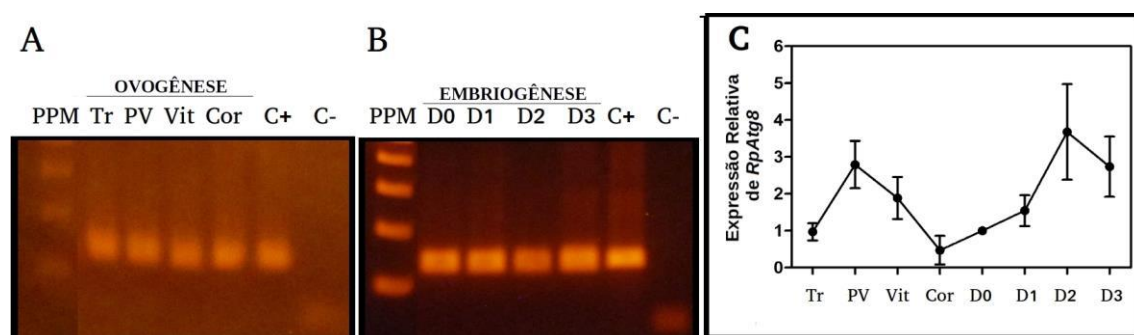


Figura 15: Expressão de *RpAtg8* durante a ovogênese e embriogênese inicial de *R. prolixus*. A, Gel de agarose com o produto de PCR do mRNA *RpAtg8*. B, Expressão relativa do mRNA *RpAtg8* analisada por qPCR durante a ovogênese e embriogênese inicial de *R. prolixus*. Ovogênese: trofário (Tr) (germário); ovócito pré-vitelogênico (PV); ovócito vitelogênico (Vit); ovócito corionado (Cor); ovos no primeiro dia de embriogênese (D0); ovos no segundo dia de embriogênese (D1); ovos no terceiro dia de embriogênese (D2); ovos no quarto dia de embriogênese (D3); (N = 4).

#### 4.3. Análise da proteína RpAtg8 durante a ovogênese e embriogênese inicial de *R. prolixus*

Com objetivo de analisar o perfil de degradação de vitelinas nas primeiras etapas de embriogênese, amostras de ovos com tempos de desenvolvimento variando até 96 horas após a fertilização foram submetidas a um SDS-PAGE. O gel mostra as primeiras bandas correspondentes aos produtos de proteólise das VTs em ovos com 72h e 96 h de desenvolvimento (seta, Figura 16). Nesse gel também estão inseridas amostras de ovócitos corionados e de ovos não fertilizados (ONF) postos por fêmeas de *Rhodnius prolixus* virgens.

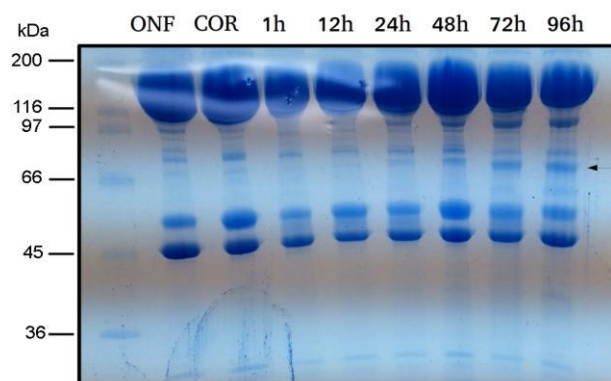


Figura 16: Perfil de proteínas do vitelo durante os primeiros dias de embriogênese em SDS-PAGE 10%. Ovócitos corionados (Cor), ovos não fertilizados (ONF) e diferentes tempos da embriogênese inicial de *Rhodnius prolixus*. 1h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h indicam o tempo de embriogênese interrompido para extração de proteínas.

A proteína Atg8 conjugada com PE regula o alongamento e fechamento do autofagossomo. Esse evento é observável com a técnica de *Western blotting* (WB) pela presença da forma Atg8-PE, que migra diferencialmente em SDS-PAGEs sendo detectada em uma banda cujo peso molecular é aparentemente menor do que o peso da proteína não conjugada (Shpilka et al., 2011; Xie et al., 2008).

O soro pré-imune e o anti-soro dos coelhos imunizados com o peptídeo do N-terminal da RpAtg8 foram usados como teste para a detecção desta proteína em amostras de intestino médio anterior (5 dias após a alimentação) e em amostras de ovos um dia depois da fertilização. Foi verificado que as amostras utilizando o soro pré-imune não apresentam bandas correspondentes ao tamanho da proteína RpAtg8, enquanto as amostras que foram incubadas com o anti-soro do coelho, isto é, após a imunização, exibem as bandas respectivas (Figura 17, A).

Dando continuidade, amostras de ovos não fertilizados, de ovócitos corionados e de ovos com até 96 h após a fertilização foram submetidas a *Western blotting* utilizando o anti-soro. Foi possível detectar a proteína RpAtg8, tanto livre como conjugada a PE do autofagossomo, em todas as amostras citadas, inclusive em ovos não fertilizados e em ovócitos corionados, extraídos de fêmeas vitelogênicas (Figura 17, B).

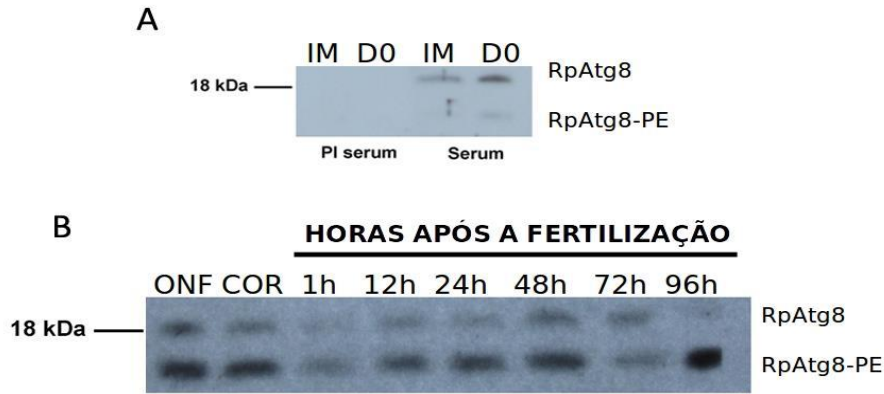


Figura 17: Detecção da proteína RpAtg8 por Western blotting em ovócitos e ovos de *R. prolixus*. (A) Testes dos anticorpos foram feitos em Western blotting com amostras de ovos no primeiro dia de embriogênese (D0) de *R. prolixus*, usando o soro pré-imune e o anti-soro. (B) Análise do Western blotting para RpAtg8 em amostras de ovócitos corionados (Cor), ovos não fertilizados (ONF) e durante o início da embriogênese de *Rhodnius prolixus*. 1h, 12h, 24h, 48h, 72h e 96h indicam o tempo de embriogênese interrompido para extração de proteínas (N = 3).

A presença da forma RpAtg8-PE em ovócitos corionados e ovos não fertilizados mostra que a provável formação de autofagossomos se inicia antes e independente da fertilização, por isso investigamos a presença da proteína durante as outras fases da ovogênese. Embora os resultados sejam preliminares, é possível observar a presença de RpAtg8-PE durante a vitelogênese massiva, indicando a formação de autofagossomos durante a ovogênese (Figura 18).

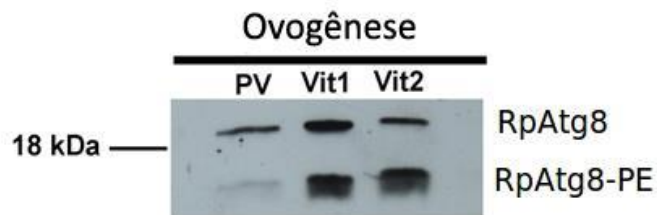


Figura 18: Resultado preliminar do Western blotting da Ovogênese. Resultados apontam para a presença de autofagossomo durante a formação dos ovócitos em *Rhodnius prolixus*. Ovócitos pré-vitelogênicos (PV); ovócitos vitelogênicos com ~0,8 mm (Vit1) e com ~1,5 mm (Vit2).

#### 4.4. Fatores que disparam autofagia: AAL e ATP

A presença de RpAtg8-PE em ovócitos indica que autofagossomos estão presentes nos ovócitos desde a ovogênese. No entanto, a degradação do vitelo só ocorre após a fertilização. Diante desse fato, questionamos o que ocasiona a possível ativação

da via autofágica durante a embriogênese inicial de *Rhodnius*, considerando que mesmo com autofagossomos formados, a autofagia não está ativa durante a ovogênese e em ovos não-fertilizados, uma vez que essas amostras não se encontram em fase de catabolismo.

Em mamíferos e leveduras, a autofagia é regulada negativamente pela ativação do complexo TOR1. TOR1 é sensível a variações nas concentrações de aminoácidos livres no citoplasma (AAL), um dos marcadores que reflete o estado nutricional da célula. Quando os níveis de AAL diminuem, TOR1 é inativada e os níveis de autofagia tendem a aumentar significativamente nas células (Jewell et al., 2013). Por isso, analisamos as concentrações de AAL em ovócitos e ovos no início da embriogênese, para verificar se este pode ser um fator que ativa a autofagia depois da fertilização (Figura 19, A). Ao longo das primeiras 24h após a fertilização, os níveis de AAL nos ovos aumentam cerca de 50%. Após 24h, esses níveis se estabilizam pelo menos até 96h de embriogênese, refletindo provavelmente a constante degradação e síntese de proteínas que ocorrem simultaneamente durante a embriogênese (*steady state levels*). Um perfil semelhante é observado nas concentrações de ATP ao longo da embriogênese inicial. As concentrações de ATP caem cerca de 40% após a fertilização quando comparadas as concentrações de ovócitos corionados (Figura 19, B).

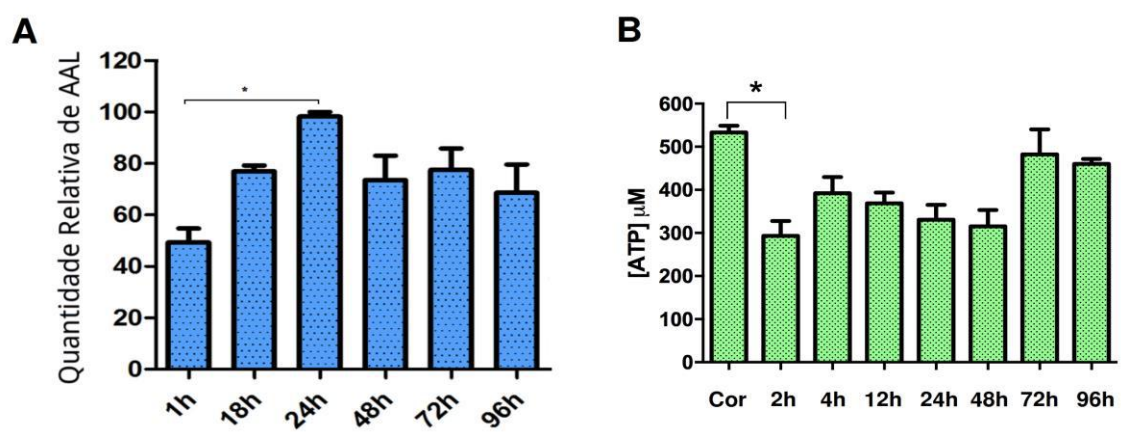


Figura 19: Gráfico das concentrações de AAL e ATP em ovos em diferentes etapas de embriogênese. (A) As concentrações relativas de aminoácidos livres no citoplasma dos ovos foram mensurados através de absorbância da reação colorimétrica utilizando ninidrina. (B) Concentrações relativas de ATP em ovócitos corionados e ovos; mensurado por HPLC. Ambos os experimentos foram realizados em triplicata (N = 3). (\* =  $p < 0,05$ ).



## 5. DISCUSSÃO

A autofagia tem um papel importante na degradação de organelas obsoletas e de aglomerados proteicos prejudiciais a célula, e na manutenção da homeostase energética e nutricional da célula, possibilitando que monômeros originados da degradação sejam utilizados em eventos de suma importância para a sobrevivência e desenvolvimento celular mediante diferentes estresses (Meléndez and Neufeld, 2008; Parzych and Klionsky, 2014). A via TOR é sensível ao estado nutricional da célula, regulando negativamente a autofagia quando a célula se encontra em condições ideais de nutrientes e energia (Chen et al., 2014; Hall, 1996).

Da mesma forma, a degradação do vitelo durante o desenvolvimento embrionário de ovíparos é um evento que leva a degradação de componentes citoplasmáticos, de forma regulada, garantindo energia e nutrientes que serão usados para construir as novas células e tecidos do embrião (Oliveira et al., 1986, 1989). Essas duas vias, por fim, levam o conteúdo de suas organelas, autofagossomos ou GV, respectivamente, para ser digerido por enzimas hidrolíticas lisossomais (Atella et al., 2005; Gosden, 2002; Wheeler, 1996). Trata-se, então, de dois tipos de degradação regulada dependentes de lisossomos.

O grupo do Laboratório de Bioquímica de Insetos tem estudado a regulação da degradação do vitelo durante a embriogênese de *R. prolixus*, e nesse contexto, a identificação do mRNA relacionado a autofagia *RpAtg8* em ovócitos deste inseto é um indicativo de que ele possui o maquinário necessário para realizar autofagia. Além disso, as altas taxas de identidade e similaridade entre as proteínas ATG8 de diferentes espécies reflete a importância dessa proteína para a via autofágica, além da importância da própria autofagia na adaptação e sobrevivência de diversas espécies ao longo da evolução.

O qPCR mostra que existe um aumento de cerca de 70 % nos níveis de expressão do mRNA *RpAtg8* em comparação com ovócitos corionados no terceiro dia depois da ovoposição, quando se dá início a digestão massiva das vitelinas. Essa diferença é um indicativo que ocorre uma possível demanda pela proteína *RpAtg8*

durante a embriogênese, isto é, assumindo que o acúmulo de transcritos resulte no aumento da tradução e ativação da proteína.

No entanto, na grande maioria dos modelos, o gene *RpAtg8* é regulado de forma pós-traducional, depois que a proteína Atg8 é traduzida, transportada para o citoplasma e conjugada a PE da membrana do fagóforo. Essa conjugação promove especialmente a expansão e o fechamento da vesícula autofágica, etapas fundamentais para a formação do autofagossomo e posterior fusão com o lisossomo, permitindo a degradação do conteúdo e o fim da via autofágica (Slobodkin and Elazar, 2013). Nesse contexto, foi essencial investigar a presença da proteína durante os primeiros dias de embriogênese por WB. A presença da RpAtg8-PE é considerada um marcador da formação de autofagossomos, nesse caso, durante a embriogênese. Esse resultado chama atenção, pois também indica a presença de RpAtg8-PE em ovócitos corionados antes da fertilização, bem como em ovos não fertilizados. Este fato sugere a presença de autofagossomos durante os primeiros dias de embriogênese, e ainda, que são de origem materna.

Não há evidências que nos levem a crer que ovócitos em crescimento estão em catabolismo, como acontece durante o desenvolvimento embrionário. Acreditamos que a presença de RpAtg8-PE nessas amostras está associada a membranas de organelas de vitelo. Mais do que isso, levantamos a hipótese de que alguns GV não são apenas lisossomos dormentes, como previamente proposto por Fagotto, 1995, mas que alguns podem ser autofagossomos dormentes, e que só seriam ativados dando continuidade a via autofágica depois da fertilização. A partir desse resultado, precisamos investigar a biogênese de autofagossomos nos ovócitos através da presença de RpAtg8-PE, e por técnicas de microscopia, imunolocalizando a proteína e investigando a presença de autofagossomos dentre os grânulos de vitelo durante a ovogênese (Klionsky et al., 2016). Recentemente, Kuhn et al., 2015, identificou autofagossomos em meio ao vitelo de *Drosophila melanogaster*, propondo um papel importante da autofagia na degradação do vitelo e que há um *feedback* entre TOR e Atg1 que regula o catabolismo do vitelo. Esse trabalho é o único trabalho na literatura, de nosso conhecimento, que correlaciona de alguma forma a autofagia com o catabolismo de vitelo.



Partindo do suposto de que em *R. prolixus* autofagossomos são formados na ovogênese mas a via autofágica só é ativada depois da fertilização, decidimos investigar possíveis fatores capazes de disparar a autofagia durante a embriogênese inicial. A via autofágica pode ser regulada pela via de controle geral de aminoácidos e pela AMPK, portanto, os níveis de aminoácidos e a relação AMP:ATP podem ser bons indicadores que processos autofágicos estão ocorrendo (Chen et al., 2014; Jewell et al., 2013; Kim et al., 2011). Ao analisar as concentrações totais de aminoácidos livres nos ovo durante os primeiros dias de embriogênese, observamos que há um aumento de cerca de 50% nas primeiras 24h de embriogênese. Essas concentrações se mantêm estabilizadas até o quarto dia de desenvolvimento do embrião, provavelmente devido às taxas contínuas de degradação e síntese de tecidos do embrião. O aumento relativo ao longo do primeiro dia sugere que as concentrações iniciais de aminoácidos podem ser suficientemente baixas para ativar a autofagia, através da inibição de TOR.

Como perspectivas, estamos buscando por outros fatores que possam regular a TOR e, então, ativar a autofagia. No momento, estamos trabalhando nos protocolos de dosagem de AMP nos ovos como outro regulador da via TOR. Isso porque se a relação AMP:ATP for alta, isto é, se a concentração de AMP aumentar em certos níveis críticos, TOR é inativada e o fluxo autofágico aumenta como forma de repor a energia da célula (Jung et al., 2010; Kim et al., 2011).

Concluindo, acreditamos que os GV, especialmente os menores, são formados utilizando o maquinário molecular da autofagia, ou seja, são formados como autofagossomos durante a ovogênese. Após as cascatas de sinalização promovidas pela fertilização, acreditamos que as moléculas de ATP e os aminoácidos livres no citoplasma dos ovos são consumidos rapidamente para as clivagens intravitelínicas e formação do blastoderma sincicial (Fonseca et al., 2012). A utilização de nutrientes imediatamente após a fertilização resulta em uma escassez momentânea, que acreditamos ser capaz de estimular a degradação do conteúdo desses supostos autofagossomos latentes, mantendo as taxas de degradação e síntese em equilíbrio.

## 6. CONCLUSÕES:

- *R. prolixus* possui a proteína Atg8 na forma RpAtg8-PE, isto é, associada a autofagossomos, em ovócitos e ovos.

- A presença da proteína RpAtg8 em diferentes fases de crescimento dos ovócitos deste inseto nos leva a crer que os autofagossomos estão sendo formados junto com as organelas de vitelo, mas que a autofagia propriamente dita, só é disparada pós-fertilização.

- O aumento de aproximadamente 50 % na concentração de aminoácidos livres no citoplasma de ovos de *R. prolixus* logo no primeiro dia após a fertilização nos leva a acreditar que as concentrações iniciais de aminoácidos podem ser suficientemente baixas para disparar o fluxo autofágico durante a embriogênese.

## 7. PERSPECTIVAS

Para investigar mais a fundo se a autofagia tem papel na degradação do vitelo, pretendemos:

- Purificar os anticorpos contra a proteína RpAtg8 por afinidade, uma vez que temos amostras do peptídeo injetado nos coelhos para produção dos anticorpos.
- Usar o anticorpo purificado para imunolocalizar a proteína RpAtg8 em ovócitos e ovos de *R. prolixus*.
- Procurar por outros fatores que possam aumentar o fluxo autofágico, como os níveis de AMP celular, e a fosforilação da AMPK como uma das enzimas reguladoras de TOR.
- Dosar aminoácidos livres em ovócitos corionados para relacionar a concentração antes e depois da fertilização.
- Procurar por estruturas comumente classificadas como autofagossomos por microscopia eletrônica.
- Silenciar o gene RpAtg8 e buscar por fenótipos na degradação do vitelo.

## 8. REFERÊNCIAS

- Alberts, B. (2015). *Molecular biology of the cell* (New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group).
- Atella, G.C., Gondim, K.C., Machado, E.A., Medeiros, M.N., Silva-Neto, M.A., e Masuda, H. (2005). Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *Acad Bras Cienc* 77, 405–430.
- Berni, M., Fontenele, M.R., Tobias-Santos, V., Caceres-Rodrigues, A., Mury, F.B., Vionette-do-Amaral, R., Masuda, H., Sorgine, M., da Fonseca, R.N., e Araujo, H. (2014). Toll signals regulate dorsal-ventral patterning and anterior-posterior placement of the embryo in the hemipteran *Rhodnius prolixus*. *EvoDevo* 5, 38.
- Chen, R., Zou, Y., Mao, D., Sun, D., Gao, G., Shi, J., Liu, X., Zhu, C., Yang, M., e Ye, W., (2014). The general amino acid control pathway regulates mTOR and autophagy during serum/glutamine starvation. *J Cell Biol* 206, 173–182.
- Fagotto, F. (1990a). Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Arch Insect Biochem Physiol* 14, 217–235.
- Fagotto, F. (1990b). Yolk degradation in tick eggs: II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme. *Arch Insect Biochem Physiol* 14, 237–252.
- Fagotto, F. (1995). Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. *J Cell Sci* 108 ( Pt 12), 3645–3647.
- Fagotto, F., e Maxfield, F.R. (1994). Changes in yolk platelet pH during *Xenopus laevis* development correlate with yolk utilization. A quantitative confocal microscopy study. *J Cell Sci* 107 ( Pt 12), 3325–3337.
- Fialho, E., Masuda, H., e Silva-Neto, M.A. (1999). Protein phosphorylation during *Rhodnius prolixus* embryogenesis: protein kinase casein kinase II activity. *Insect Biochem Mol Biol* 29, 215–223.
- Fialho, E., Silveira, A.B., Masuda, H., e Silva-Neto, M.A. (2002). Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 871–880.

Fialho, E., Nakamura, A., Juliano, L., Masuda, H., e Silva-Neto, M.A. (2005). Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 436, 246–253.

Fonseca, R.N. da, Gomes, H., e Araújo, H. (2012). Aspectos Morfofuncionais da Embriologia dos Artrópodes. In *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*, p. 34.

Gosden, R.G. (2002). Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 186, 149–153.

Hall, M.N. (1996). The TOR signalling pathway and growth control in yeast. *Biochem Soc Trans* 24, 234–239.

Heming, B.S., e Huebner, E. (1994). Development of the germ cells and reproductive primordia in male and female embryos of *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). *Can. J. Zool.* 72, 1100–1119.

Hong, S., Zhao, B., Lombard, D.B., Fingar, D.C., e Inoki, K. (2014). Cross-talk between sirtuin and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling in the regulation of S6 kinase 1 (S6K1) phosphorylation. *J Biol Chem* 289, 13132–13141.

Huang, R., Xu, Y., Wan, W., Shou, X., Qian, J., You, Z., Liu, B., Chang, C., Zhou, T., Lippincott-Schwartz, J., et al. (2015). Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Mol Cell* 57, 456–466.

Jacinto, E., e Hall, M.N. (2003). Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 117–126.

Jewell, J.L., Russell, R.C., e Guan, K.-L. (2013). Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 133–139.

Jung, C.H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N.M., e Kim, D.-H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 584, 1287–1295.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., e Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141.

Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12, 1–222.

Knorr, R.L., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., Lipowsky, R., Baumgart, T., e Dimova, R. (2014). Membrane morphology is actively transformed by covalent binding of the protein Atg8 to PE-lipids. *PLoS One* 9, e115357.

Kuhn, H., Sopko, R., Coughlin, M., Perrimon, N., e Mitchison, T. (2015). The Atg1-Tor pathway regulates yolk catabolism in *Drosophila* embryos. *Dev. Camb. Engl.* 142, 3869–3878.

Mallya, S.K., Partin, J.S., Valdizan, M.C., e Lennarz, W.J. (1992). Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. *J. Cell Biol.* 117, 1211–1221.

Mauvezin, C., Sancho, A., Ivanova, S., Palacin, M., e Zorzano, A. (2012). DOR undergoes nucleo-cytoplasmic shuttling, which involves passage through the nucleolus. *FEBS Lett.* 586, 3179–3186.

McPhee, C.K., e Baehrecke, E.H. (2009). Autophagy in *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta* 1793, 1452–1460.

Meléndez, A., e Neufeld, T.P. (2008). The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story. *Development* 135, 2347–2360.

Melo, A.C., Valle, D., Machado, E.A., Salerno, A.P., Paiva-Silva, G.O., Cunha E Silva, N.L., de Souza, W., and Masuda, H. (2000). Synthesis of vitellogenin by the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 549–557.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., e Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069–1075.

Motta, L.S., da Silva, W.S., Oliveira, D.M.P., de Souza, W., e Machado, E.A. (2004). A new model for proton pumping in animal cells: the role of pyrophosphate. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 19–27.

Murrow, L., and Debnath, J. (2015). A nuclear option that initiates autophagy. *Mol Cell* 57, 393–395.

Nagy, P., Varga, Á., Kovács, A.L., Takáts, S., e Juhász, G. (2015). How and why to study autophagy in *Drosophila*: it's more than just a garbage chute. *Methods San Diego Calif* 75, 151–161.

Nair, U., Yen, W.L., Mari, M., Cao, Y., Xie, Z., Baba, M., Reggiori, F., e Klionsky, D.J. (2012). A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis. *Autophagy* 8, 780–793.

Nussenzveig, R.H., Oliveira, P.L., e Masuda, H. (1992). Identification of yolk platelet-associated hydrolases in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 21, 253–262.

Oliveira, P.L., Gondim, K.C., Guedes, D.M., e Masuda, H. (1986). Uptake of yolk proteins in *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol* 32, 7.

Oliveira, P.L., Dansa-Petretski, M., e Masuda, H. (1989). Vitellin processing and degradation during embryogenesis in *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem.* 19, 9.

Parzych, K.R., e Klionsky, D.J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 460–473.

Raikhel, A.S., e Dhadialla, T.S. (1992). Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 217–251.

Masuda, H., Ramos, I., e Winter, C. (2012). Vitelogênese nos Ecdisozoa: Nematoides e Insetos como Exemplos. In *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular*, p. 45.

Ramos, I.B., Miranda, K., De Souza, W., e Machado, E.A. (2006). Calcium-regulated fusion of yolk granules during early embryogenesis of *Periplaneta americana*. *Mol Reprod Dev* 73, 1247–1254.

Russell, R.C., Yuan, H.X., e Guan, K.L. (2014). Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res* 24, 42–57.

Salerno, A.P., Dansa-Petretski, M., Silva-Neto, M.A.C., Coelho, H.S.L., e Masuda, H. (2002). *Rhodnius prolixus* vitellin is composed of three different populations: comparison with vitellogenin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 709–717.

Santos, R., Rosas-Oliveira, R., Saraiva, F.B., Majerowicz, D., e Gondim, K.C. (2011). Lipid accumulation and utilization by oocytes and eggs of *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol* 77, 1–16.

Shintani, T., e Klionsky, D.J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306, 990–995.

- Shpilka, T., Weidberg, H., Pietrokovski, S., e Elazar, Z. (2011). Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol* 12, 226.
- Slobodkin, M.R., e Elazar, Z. (2013). The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays Biochem.* 55, 51–64.
- Spowart, J., e Lum, J.J. (2010). Opening a new DOR to autophagy. *EMBO Rep.* 11, 4–5.
- Tanida, I., Ueno, T., e Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2503–2518.
- Tindwa, H., Jo, Y.H., Patnaik, B.B., Lee, Y.S., Kang, S.S., e Han, Y.S. (2015). Molecular cloning and characterization of autophagy-related gene TmATG8 in *Listeria*-invaded hemocytes of *Tenebrio molitor*. *Dev. Comp. Immunol.* 51, 88–98.
- Tsukada, M., e Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 169–174.
- Valle, D. (1993). Vitellogenesis in insects and other groups--a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 88, 1–26.
- Walter-Nuno, A.B., Oliveira, M.P., Oliveira, M.F., Gonçalves, R.L., Ramos, I.B., Koerich, L.B., Oliveira, P.L., e Paiva-Silva, G.O. (2013). Silencing of maternal heme-binding protein causes embryonic mitochondrial dysfunction and impairs embryogenesis in the blood sucking insect *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem* 288, 29323–29332.
- Wheeler, D. (1996). The role of nourishment in oogenesis. *Annu. Rev. Entomol.* 41, 407–431.
- Xie, Z., e Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9, 1102–1109.
- Xie, Z., Nair, U., e Klionsky, D.J. (2008). Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* 19, 3290–3298.
- Yen, W.L., e Klionsky, D.J. (2008). How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiol. Bethesda* 23, 248–262.